

深圳市学校结核病监测中基因分型技术的研究

洪创跃, 李金莉, 杨争, 王峰, 余卫业

深圳市慢性病防治中心, 广东 深圳 518020

摘要: **目的** 应用 DiversiLab 基因分型系统对深圳市学校结核分枝杆菌进行基因分型,初步探讨其分型特征以及在学校结核病监测中的应用。**方法** 对来自 2015 年深圳市学校结核病患者的 41 株结核分枝杆菌菌株,采用 DiversiLab 基因分型系统对其进行基因分型。**结果** DiversiLab 基因分型系统将 41 株结核分枝杆菌分为 8 个基因群,分型显示高度多态性,各个基因群分别占比为 I 群 12.2% (5/41)、II 群 22.0% (9/41)、III 群 7.3% (3/41)、IV 群 24.4% (10/41)、V 群 17.1% (7/41)、VI 群 2.3% (1/41)、VII 群 9.8% (4/41)、VIII 群 4.9% (2/41),以 II 群和 IV 群为主。各个基因群的患者均有来自深圳户籍、广东省户籍和广东省外户籍的人口,深圳户籍患者主要基因型集中在 IV 群 (33.3%, 4/12) 和 V 群 (41.7%, 5/12) 基因群中。各个基因型与户籍人口之间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 15.280, P = 0.270 > 0.05$)。研究中发现了 5 株耐药菌株,耐药菌株同样来自各个不同的户籍人口,但是并未发现统计学联系 ($\chi^2 = 4.237, P = 0.077 > 0.05$)。**结论** 深圳市学校结核病基因分型存在高度多样性,有主要流行基因群,并且存在跨区域流行传播的可能性。

关键词: DiversiLab 系统;结核分枝杆菌;核酸扩增技术

中图分类号: R521 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)11-1388-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2019.11.030

近年来,我国学校结核病疫情屡见报道,国外的研究报道也不在少数,而这些研究报道主要集中在暴发疫情的处置以及健康促进等方面,对其监测预警的研究涉及较少^[1-6]。结核病分子流行病学的研究在传播链调查以及菌株溯源方面拥有独特的优势^[7-10],以此为基础建立起分子流行病学监测体系,可在一定程度上发现学校结核病是以往传播引起,还是近期传播所导致,为学校结核病的防控策略提供新的思路。

Diversilab 微生物基因分型鉴定系统作为基因分型方法的一种,常用于分子流行病学研究中。Jang 等^[11]采用 Diversilab 微生物基因分型鉴定系统分析了结核分枝杆菌,并与 IS6110-RFLP 分型技术相比较,两种方法显示无差异。Christianson 等^[12]则对非结核分枝杆菌进行了分型分析,以 MIRU - VNTR 方法作为对照,同样无差异性。国内孙小军等^[13]分析了 100 株结核分枝杆菌,分型结果显示高度多态性。本次研究采用该基因分型技术对 2015 年深圳市收集到的 41 株学校结核病临床分离菌株进行基因分析研究,初步了解其基因分型分布特征及流行情况,探讨基因分型在学校结核病监测中的应用价值。

1 材料与方法

基金项目: 深圳市卫生计生系统重点学科建设能力提升项目 (201606044)

作者简介: 洪创跃 (1984-),男,广东深圳人,硕士,主治医师,研究方向:结核病实验室诊断及预防。

1.1 患者菌株来源 收集 2015 年深圳市慢性病防治中心以及深圳市各区慢性病防治院诊断为学校结核病患者的菌株,并采用线性探针技术快速检测利福平 (rifampicin, R) 和异烟肼 (isoniazid, I) 的药物敏感性。所有患者均为初诊患者,其中男生 24 人,女生 17 人;年龄分布在 13~28 岁,平均年龄为 (19.0±3.8) 岁。

1.2 主要仪器及试剂 MO BIO UltraClean™ Microbial DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories, 美国 Solana Beach 公司)、分光光度计、rep-PCR DNA fingerprinting kit (生物梅里埃公司,法国) Agilent 2100 生物分析仪 (美国 Agilent Technologies 公司)、PCR 仪 (伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司)、GenoType MTBDR plus 试剂盒 (德国 Hain Lifescience 公司)、GT-Blot 全自动杂交仪 (德国 Hain Lifescience 公司)

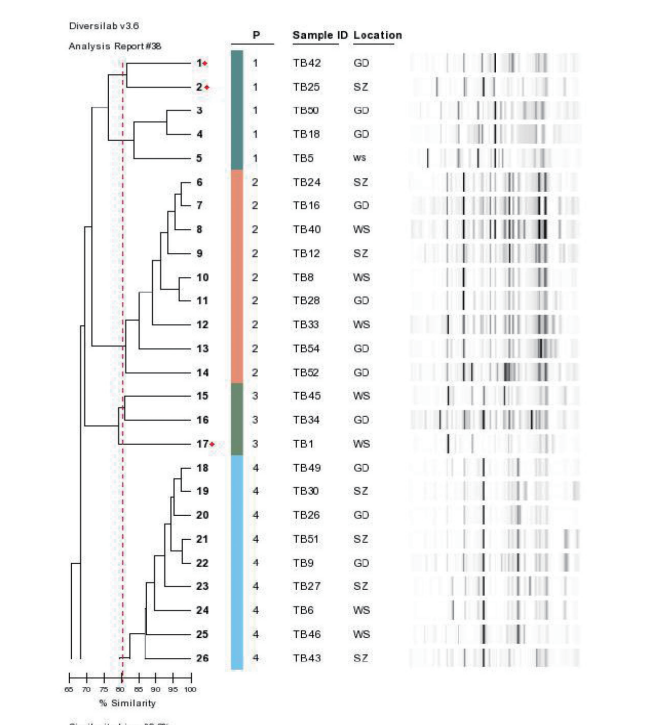
1.3 DiversiLab 系统分子分型^[14] (1) DNA 提取:应用 MO BIO UltraClean™ Microbial DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA。经分光光度计测定,调整 DNA 的浓度为 25~50 ng/L。(2) rep-PCR 扩增:应用 rep-PCR DNA 指纹图谱试剂盒,配制 25 μl PCR 扩增体系:0.5 μl AmpliTaq 聚合酶,2 μl 混合引物,2.5 μl 10× PCR 缓冲液及 18 μl rep-PCR master mix。预变性 94℃ 2 min,94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 30 s,70℃ 延伸 90 s 为一个循环,共 35 个循环;最后 70℃ 延伸 3 min。(3) PCR 扩增产物检测:应用微流体芯片和 Agilent 2100 生物分析仪分离和检测不同大小和强度的 PCR 扩增产物。

1.4 评价标准 分析结果的虚拟凝胶图像的判断标准参照分为 3 种:不存在差异(indistinguishable),其相似性大于 97%,并且没有条带差异;相似(similar),其相似性大于 95%,有 1~2 条不同的条带;不同(different),其相似性小于 95%,大于 2 条不同的条带。其相似性大于 95%即可认为存在疾病爆发或者流行的可能。

1.5 统计学分析 DiversiLab version 3.4 自带软件依据 Pearson 相关系数(Pearson correlation coefficient, PC)分析和计算各样本的相似性系数。非加权组平均数(unweighted pair group method with arithmetic averages,UPGMA)自动比较 rep-PCR 产物并创建树状图。数据的分析结果包括树状图和电泳图谱。采用 χ^2 检验进行统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DiversiLab 系统分型 41 株菌株分型根据 DiversiLab 系统分析共得到 8 个基因群,各个基因群分别占比为 I 群 12.2%、II 群 22.0%、III 群 7.3%、IV 群 24.4%、V 群 17.1%、VI 群 2.3%、VII 群 9.8%、VIII 群 4.9%,以 II 群和 IV 群为主。其中 III 群的 TB16 和 TB24;IV 群的 TB30 和 TB49 以及 TB9 和 TB51;V 群的 TB35 和 TB55;相似度均为大于 97%,为不存在差异菌株。具体见图 1。



注: Location 中的 GD 代表户籍为广东省内户籍(深圳除外)SZ 代表户籍为深圳户籍,WS 代表为广东省外户籍。

图 1 DiversiLab 系统分型结果

2.2 菌株地域与分型的关系 8 个基因群菌株分别来自深圳户籍人口(12)、广东省户籍人口(16)和广东省外户籍人口(13),广东省户籍和广东省外户籍基因群散在分布在 8 个基因群中,深圳户籍人口主要集中在 IV 群和 V 群。深圳户籍、广东省内户籍和广东省外户籍的基因分型构成差异无统计学意义($\chi^2=15.280$, $P=0.270$)。见表 1。

表 1 患者户籍与分型特征分布情况

基因群	户籍			总计
	深圳市	广东省	广东省外	
I 群	1	3	1	5
II 群	2	4	3	9
III 群	0	1	2	3
IV 群	4	3	3	10
V 群	5	2	0	7
VI 群	0	1	0	1
VII 群	0	2	2	4
VIII 群	0	0	2	2
总计	12	16	13	41

2.3 菌株耐药情况 通过 HAIN 快速基因检测耐药,得到耐药菌株 5 株,其余均为敏感菌株,见表 2。5 株耐药株中有 3 株来源于深圳本地,包括 2 株 MDR 菌株。广东省内户籍和广东省外户籍各有 1 株耐药菌株,耐药菌株的户籍来源差异无统计学意义($\chi^2=4.237$, $P=0.077$)。

表 2 患者药敏菌株与分型特征分布情况

基因群	耐药性		总计
	耐药株	敏感株	
I 群	0	5	5
II 群	2	7	9
III 群	0	3	3
IV 群	1	9	10
V 群	1	6	7
VI 群	0	1	1
VII 群	1	3	4
VIII 群	0	2	2
总计	5	36	41

3 讨论

由于结核病具有潜伏感染的特点,并且不同个体的潜伏长短差异明显,因此往往无法确定结核病发病是由于以往感染引起,还是近期传播导致,这也是目前结核病防控存在的难题之一[7]。分子流行病学的建立以及运用,则很好为我们提供解决这个难题的突破口。通过分析不同菌株的基因型,可以提示既往感染还是近期传播的情况。

学校是一个聚集性场所,结核病感染容易引起聚集性疫情的发生,即使是在结核病低发的地区也有学校结核爆发流行的报道[4-6],而在我国这种情况也并不是少见。除此之外,学校结核病还存在跨区域传播可

能性的问题,特别对于深圳地区来说,流动人口占绝大多数,学生往往在某一学校学习一段时间即转校,或者是返回原籍^[15]。另外学校结核病高发的人群主要是初中、高中和大学低年级的学生,这些学生在学习 3 年毕业之后会转移到另一区域的学校就读,这也为跨区域传播提供了条件^[16]。本研究中的结果也提示了这种可能性,8 个基因群的患者均来自不同的区域,并且有 3 组不存差异的菌株来自深圳户籍人口和广东省其他地区人口,另外还有 3 组来自广东省外和广东省内的菌株为相似性菌株,同时这些分型菌株不存在地域之间的统计学差异,这说明在感染过程中引起跨区传播的链条,提示我们在防控策略上,需要加强对流动人口的监测。

DiversiLab 系统作为一种实验室流行病学的分型方法,已有报道被广泛运用于各种细菌的分型研究中,其中包括结核分枝杆菌^[17]。本次研究分析了 41 株结核分枝杆菌,DiversiLab 系统将所有菌株分为了 8 组基因群,这些基因群菌株,分别来自不同户籍人口,并且在无差异的菌株中,出现耐药与敏感的不同菌株,说明存在传播的可能,应该引起重点关注。敏感菌株变为耐药菌株,有几方面的原因,除了由于不当的治疗方案引起的耐药情况,近来研究还发现存在异质性耐药的情况^[18]。由于 MTB 存在自发性突变,即使全敏感的菌株中也存在一定比例的耐药菌,在临床不断治疗中,敏感菌株逐渐被杀死,耐药菌则成为了优势菌株,该敏感菌株则变成了耐药菌。在本次研究中,同一基因群中出现了耐药菌株和敏感菌株的情况,并且这两个患者来自不同的地区且均为初治患者,没有以往感染史。因此该菌株可能发生异质性耐药的情况,并且在这过程中产生了传播。从本次研究的结果中可以看出,对全地区的学校结核菌的分子流行病监测,能够获得更多的流行传播信息,前期我国学者的研究也表明了结核分枝杆菌基因分型在结核病传播链调查中发挥的独特作用^[7-8]。

综上所述,深圳市学校结核病存在跨区域流行传播的可能性,需要对不同地区出现的病人做更进一步深入的流行病学调查。基因分型技术可应用于深圳市学校结核病的基因分型监测,在一定程度上可了解不同地区的学校结核病是否存在流行病学联系,为之后更进一步的调查和制定相应的防控策略,提供基础资料。

参考文献

- [1] 李源,张峰,高风华,等.山东省淄博市 2005-2011 年结核病疫情分析[J].现代预防医学,2014,41(6):1130-1134.
- [2] 庞艳,刘英,汪清雅,等.2016 年重庆市学校结核病疫情流行概况

分析[J].实用预防医学,2018,25(1):10-13.

- [3] 李平,黄文忠,于中青,等.浦江县 2011-2015 年学生肺结核流行特征及预防措施[J].实用预防医学,2017,24(7):859-861.
- [4] Abubakar I, Matthews T, Harmer D, et al. Assessing an outbreak of tuberculosis in an English college population [J]. Eur Respir J, 2011, 38(4):976-978.
- [5] Faccini M, Codecasa LR, Ciconali G, et al. Tuberculosis outbreak in a primary school, Milan, Italy [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(3):485-487.
- [6] Golesi F, Brignatz J, Bellenfant M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing outbreak in school in Marseille, France, 2012 [J]. Euro Surveill, 2013, 18(2):pii:20354.
- [7] 李建琴,汪延举,史衍席,等.采用分子流行病学和传统调查相结合分析嘉祥县某中学结核病聚集性疫情[J].中国防痨杂志,2012,34(10):655-659.
- [8] 李玉新,王鸣秋,周丽平,等.一起学校结核病暴发疫情 1 临床株基因同源性分析[J].公共卫生与预防医学,2013,24(3):99-110.
- [9] Mustafa Ali R, Trovato A, Couvin D, et al. Molecular epidemiology and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Baghdad [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(7):580981-580995.
- [10] Mokrousov I, Vyazovaya A, Zhuravlev V, et al. Real-time PCR assay for rapid detection of epidemiologically and clinically significant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(5):1691-1693.
- [11] Jang MH, Choi GE, Shin BM, et al. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system with IS6110-restriction fragment length polymorphism for epidemiologic investigation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Korea [J]. Korean J Lab Med, 2011, 31(4):282-284.
- [12] Christianson S, Wolfe J, Soualhine H, et al. Comparison of repetitive-sequence-based polymerase chain reaction with random amplified polymorphic DNA analysis for rapid genotyping of nontuberculosis mycobacteria [J]. Can J Microbiol, 2012, 58(8):953-964.
- [13] 孙小军,金法祥,王华钧.绍兴地区结核分枝杆菌临床分离株 Rep-PCR 基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2013,23(18):4357-4359.
- [14] Wise MG, Siragusa GR, Plumblee J, et al. Predicting *Salmonella enterica* serotypes by repetitive sequence-based PCR [J]. J Microbiol Methods, 2009, 76(1):18-24.
- [15] 管红云,谭卫国,杨应周,等.2009-2013 年深圳市学生结核病流行特征分析[J].临床肺科杂志,2016,21(8):1496-1499.
- [16] 管红云,谭卫国,杨应周,等.深圳市学生肺结核发病影响因素的病例对照研究[J].中国防痨杂志,2016,38(6):486-492.
- [17] Cangelosi GA, Freeman RJ, Lewis KN, et al. Evaluation of a high-throughput repetitive-sequence-based PCR system for DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex strains [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6):2685-2693.
- [18] Sun G, Luo T, Yang C, et al. Dynamic population changes in *Mycobacterium tuberculosis* during acquisition and fixation of drug resistance in patients [J]. J Infect Dis, 2012, 206(11):1724-1733.

收稿日期:2018-11-27